

公開特許公報

昭53—104796

⑤Int. Cl.² 識別記号 ⑥日本分類 庁内整理番号 ④公開 昭和53年(1978)9月12日
 C 12 D 9/14 36(2) D 531.1 7110—49
 C 12 D 13/00 1 4 0 36(2) D 914 7048—49 発明の数 1
 審査請求 未請求

(全 7 頁)

④抗生物質の製造法

②特 願 昭52—20080
 ②出 願 昭52(1977)2月24日
 ⑦発 明 者 北野一昭
 吹田市津雲台5丁目18番地
 同 金高一彦

高槻市富田丘町13番地18号
 ⑦発 明 者 片本和義
 吹田市桃山台3丁目13番4号
 ⑦出 願 人 武田薬品工業株式会社
 大阪市東区道修町2丁目27番地
 ⑦代 理 人 弁理士 松居祥二

明 細 書

1. 発明の名称

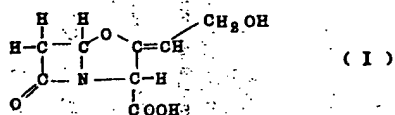
抗生物質の製造法

2. 特許請求の範囲

新菌種ストレプトミセス・カツラハマヌスを培地に培養し、クラバラン酸を生成蓄積せしめ、培養物からクラバラン酸を採取することを特徴とする抗生物質の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新菌種ストレプトミセス・カツラハマヌスを用いる次式で示されるクラバラン酸(I)の製造法に関するものである。



クラバラン酸は、(I)式で示される化合物であつて、ごく最近コーンらによつて、ストレプトミセス・クラブリゲルス(*Streptomyces clavuligerus*)の培養物から単離され(コ

ールら;公開特許公報特開昭50-142789 1
 およびジャーナル・オブ・アンティバイオタイクス,第29巻,668頁,1976年に記載)、
 β-ラクタマーゼ阻害物質として注目されている
 化合物である。本物質は、それ自身、グラム陽性 5
 および陰性菌に対し、抗菌活性を有し、感染症の
 治療に用いられる他、そのβ-ラクタマーゼ阻
 害作用を利用して、ペニシリンやセファロsporin
 類と併用することによつて、ペニシリンやセフ
 アロsporin類の抗菌活性を増大させることがで 10
 きる。また、本化合物は、新しい半合成β-ラク
 タム化合物の出発原料となりうることも予想され、
 極めて重要な化合物である。しかるに、その生産
 は、ストレプトミセス・クラブリゲルスの1菌株
 NRRL8585について知られているにすぎず、 15
 その生成量も、工業的に必ずしも十分なものでは
 ない。

本発明者らは、新規なβ-ラクタム抗生物質を
 生産する微生物を得る目的で鋭意スクリーニング
 を続けている過程で、高知市の土壌より分離され 20

た1菌株T-272株が、極めて微量のβ-ラク
タム化合物を生産することを見出し、そのβ-ラ
クタム化合物を結晶として単離し、その理化学的
性状を調べたところ、本化合物は、クラバラン酸
(I)と全く一致することが明らかになった。一
方、生産菌T-272株の菌学的性状について種
々検討を加えたところ、本菌はストレプトミセス
属に属するが、公知のいずれの種にも属さない新
菌種の微生物であることを見出し、この新菌種を
ストレプトミセス・カツラハムスと命名した。
これらの知見に基づきさらに研究した結果、本発
明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、新菌種ストレプトミセス
・カツラハムスを培地に培養し、クラバラン酸
を生成蓄積せしめ、培養物からクラバラン酸を採
取することを特徴とする抗生物質の製造法である。

以下に、T-272株の分類学的諸性質を列記
し、この株がストレプトミセス属の新菌種に属
するものであることを明らかにする。

T-272株の菌学的性状

a) 形態学的特徴

気菌糸は比較的長く伸長し、単軸分岐する。そ
の先端の形態は一般にオーブンスパイラル状であ
るが、培地によつては曲状またはループ状も含ま
れる場合がある。胞子鎖は10個以上の胞子より
なり、その形は、精円体ないし短円筒状で、大き
さは $0.6 \sim 0.8 \times 0.9 \sim 1.2 \mu$ 、表面構造は平滑
状である。鞭毛胞子、胞子のうの形成は認められ
ない。

b) 各種培地における生育状態

T-272株の各種培地における生育状態を表
1に示す。

c) 生理的性質

1) 生育温度

至適温度は $25 \sim 28^{\circ}\text{C}$ で、 87°C では生育し
ない。

表 1

培養基	生育	気菌糸	裏面	可溶性色素
シュウクロース・ 硝酸塩寒天	微弱、薄い、無色	貧弱、白色～淡灰色	無色	なし
グルコース・硝酸塩 寒天	生育しない			
グリセロール・硝酸塩 寒天	微弱、薄い、無色	貧弱、白色	無色	なし
グルコース・アスパ ラギン寒天	中程度、無色	貧弱ないし中程度、 白色	無色	なし
グリセロール・アス パラギン寒天	中程度、薄い、無色	貧弱ないし中程度、 白色	無色	無色～淡赤褐色 人的に淡赤褐色
スターチ・硝酸塩寒天	中程度、無色	中程度ないし豊富、 白色～灰褐色、 培地の表面に生ずる	淡黄褐色	淡黄褐色
チロシン寒天	中程度、薄い、淡 赤褐色	貧弱、白色	淡赤褐色	淡赤褐色
栄養寒天	中程度、無色	非常に貧弱、白色	淡黄褐色	なし
グルコース・栄養寒天	中程度、無色	貧弱、白色	淡黄褐色	なし
培養基	生育	気菌糸	裏面	可溶性色素
イースト・麦芽寒天	良好、平坦、淡黄 褐色	豊富、灰褐色、白 色のハゲを生ずる	淡黄褐色	黄褐色
オートミール寒天	中程度、薄い、無色	貧弱ないし中程度、 白色、灰褐色	無色	なし
ペプトン・イースト・ 鉄寒天	中程度、無色	なし	無色	なし
トリプトン・イースト・液 寒天	中程度ないし豊富、淡 褐色、培地の表面に生ずる、 培地の表面に生ずる、淡褐色	貧弱、白色	無色	なし
グリセロール・リンゴ 酸カンシウム寒天	非常に貧弱、無色	なし	無色	なし
馬鈴薯片	貧弱ないし中程度、 褐色	貧弱、淡灰色		褐色
馬鈴薯片 CaCO ₃ 入り	中程度、褐色	貧弱、淡灰色		褐色
人糞片	生育しない			
人糞片 CaCO ₃ 入り	貧弱ないし中程度、 無色	貧弱ないし中程度、 白色		なし

- 2) 生育 pH
pH 6~10 で生育, 至適 pH は 8~9。
- 3) ゼラチンの液化: 陽性
- 4) デンプンの加水分解: 陽性 (中程度)
- 5) 脱脂牛乳の凝固, ペプトン化: 凝固せず, ペプトン化する。
- 6) 硝酸塩の還元: 陰性
- 7) メラニン様色素の生成: 陰性
- 8) セルロースの加水分解: 陰性
- d) 炭素源の利用性
ブリードハム・ゴドリーブ寒天培地で調べた結果を表 2 に示す。
- e) 細胞壁構成成分: L, L-ジアミノピリン酸を含む。

表 2

炭素源	利用性	
L-アラビノース	—	1
D-キシロース	—	
D-グルコース	—	5
D-フラクトース	—	
シクロロース	—	
イノシトール	—	
L-ラムノース	—	
ラフィノース	—	10
D-マンニトール	—	
スターチ	+	
グリセロール	+	
D-リボース	+	
1 コハク酸ナトリウム	+	15
マルトース	+	
対照 (無添加)	—	

注; +: 利用する (発育する), -: 利用せず

2) (発育せず)

20

以上の性状から T-272 株は、まずストレプトミセス属に属していることは明らかである。ワックスマン著、ザ・アクチノミセテス (The Actinomycetes) 第 2 巻 (1961 年), シヤーリングおよびゴットリーブの I S P (インターナショナル・ストレプトミセス・プロジェクト (International Streptomyces Project)) 報告 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムアティック・バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology), 第 18 巻 69 頁, 279 頁 (1968), 同第 19 巻, 891 頁 (1969), 同第 22 巻, 265 頁 (1972)) およびバーゴーズ・マニユアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第 7 版 (1961), 第 8 版 (1974) およびその後報告された放線菌の新種発表文献の中から検索すると、T-272 株のように、気菌糸が灰青色ないし灰緑色で、胞子鎖

がらせん状、胞子表面が平滑である菌種は、極めて少ないが、T-272 株とやや類似するものとしては、ストレプトミセス・アマクサエンス (Streptomyces amakusaensis Nagatsu et al.) (ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (Journal of Antibiotics) シリーズ A・第 16 巻, 207 頁 (1968)) およびストレプトミセス・トサエンス (Streptomyces tosaensis Kouno et al.) (特許公報特昭 49-1871) があげられる。T-272 株の性状をこれら 2 株の原記載と比較するとともに、さらにストレプトミセス・アマクサエンス I S P 5219 (IFO 12885) およびストレプトミセス・トサエンス Form. P-601 と T-272 株とを同一条件下で培養して性質を比較した。T-272 株とこれら 2 菌種との主な相違点を表 8 にまとめた。

これによると、ストレプトミセス・アマクサエンスとは、気菌糸の形態が明らかに異なり、さらに、本菌がメラニン様色素を形成するのに対し、

T-272株は、メラニン様色素を形成しない点から明確に区別された。また、ストレプトミセス・トサエンシスとも、気菌糸の形態が明らかに異なること、および炭素源の利用性が全く異なる点さらに、硝酸塩の還元性の点でも異なり明らかに別種の菌株と考えられる。

(以下余白)

表 8

気菌糸の形態	炭素源の利用性	T-272株 オーブ・スパイラル	ストレプトミセス・ アマクサエンシス クローズ・スパイラル	ストレプトミセス・ トサエンシス クローズ・スパイラル	ゼラチンの液化	硝酸塩の還元	メラニン様色素の生成
D-マンニトール		-	-	+	液化する	還元しない	生成しない
D-キシロース		-	-	+	還元しない	還元しない	生成しない
D-グルコース		-	-	+	還元しない	還元しない	生成しない
D-フラクトース		-	-	+	還元しない	還元しない	生成しない
ラフィノース		-	-	+	還元しない	還元しない	生成しない
ゼラチン		液化する	液化しない	液化する	液化する	還元しない	生成しない
硝酸塩		還元しない	還元しない	還元しない	還元しない	還元しない	生成しない
メラニン様色素		生成しない	生成する	生成する	生成しない	生成する	生成しない

注：+：利用する（発育する）、-：利用せず（発育せず）

さらに、従来、クラブラン酸を生産することが知られているストレプトミセス・クラブリゲルス NRRL 8585（ヒゲンス・カスター、インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムエツク・バクテリオロジー、第21巻826頁（1971））とも比較したが、NRRL 8585株の場合には気菌糸の形態に特徴があり、直・曲状で、短い棍棒状の数の胞子よりなる側枝が形成される。これに対して、T-272株は、オーブンスパイラル状であり、したがって全く異なる種に属することは明らかである。

以上の事実から、T-272株はストレプトミセス属の既知菌種のいずれにも属さず、新菌種と認められ、本菌が分離された土壌の採取地にちなんで、ストレプトミセス・カツラハマンヌス（*Streptomyces katsurahamanus*）と命名された。T-272株は、財団法人発酵研究所および工業技術院微生物工業技術研究所に、IFO-18716、申請書受理番号第3944号としてそれぞれ寄託されている。

ストレプトミセス・カツラハマンヌスの性状は、上記の通りであるが、本発明においては、ストレプトミセス・カツラハマンヌスに属する株はすべて使用することができる。また、放線菌とりわけストレプトミセス属に属する微生物の諸性質は一定なものではなく、自然的にあるいは人工的に容易に変異することは周知のことであり、本菌種の場合もその例外ではなく、たとえば紫外線、エックス線、放射線照射、薬品（例、亜硝酸ナトリウム、

5

10

15

20

ホルメチル-β-ニトロ-β-ニトロソグアニジンなど）処理などの人工的変異手段で容易に変異しうるものであり、このような変異株であつても、クラブラン酸生産能を有するものはすべて本発明の方法に使用することができる。

本菌の培養に際しては、培地中に炭素源として、たとえばグルコース、シユークロース、マルトース、スターチ、グリセリン、デキストリン、水あめ、糖蜜、油脂類（例、大豆油、オリーブ油など）、アルコール類（例、エタノール）、有機酸類（例、コハク酸、リンゴ酸など）など菌が酸化しうるも

のが適宜用いられる。窒素源としては、たとえば大豆粉、コーン・ステイブ・リカー、棉実粉、肉エキス、ペプトン、尿素、乾燥酵母、酵母エキス、アンモニウム塩類（例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなど）、硝酸塩類（例、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウムなど）などが有利に使用される。無機塩としては、たとえば炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウムなどが挙げられ、さらに、菌の発育を助けクラバラン酸の生産を促進する有機または無機の化合物（例、ビタミン類、核酸塩基類、アミノ酸類など）などを適宜添加してもよい。

培養は、液状でも固状でもよく、また液状の場合、静置あるいは振盪培養のいずれでもよいが、好氣的条件下に深部培養するのが一般に有利である。又培養温度はおよそ18〜35℃の範囲が望ましく、培地のpHは約5〜10、好ましくは約7〜9の範囲で、およそ24〜240時間培養するのが好ましい。

ることにより遊離あるいはその塩、たとえばナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩として採取される。

本発明は、前記したように、新菌種ストレプトミセス・カツラハマヌスを用いることにより、極めて少量のクラバラン酸を生成蓄積せしめることができるので、工業上有利な方法である。

以下に実施例をもつてさらに詳細に本発明の内容を説明するが、これによつて本発明が限定されるものではない。

実施例1

グルコース8%、コーンスターチ8%、棉実粉1%、大豆粉0.5%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.5%、コーン・ステイブ・リカー0.5%および炭酸カルシウム1%からなる種培地30mlを200ml容三角フラスコに分注、滅菌後、これにストレプトミセス・カツラハマヌスT-272（微生物研究開発番号第3944号）を一日金耳づつ接種し、回転式振盪培養機上で28℃8日

生成したクラバラン酸の大部分は培養液中に存在するので、通常培養物を遠心分離あるいは濾過して菌体を除去した液体部分からこれを採取するのがよい。クラバラン酸の採取には、微生物の生産する代謝産物を採取するのに通常用いられる手段が適宜に利用される。すなわち、イオン交換樹脂、活性炭、セルロース、シリカゲル、非イオン性ポリスチレンポリマーなどを用いるクロマトグラフィー、ゲル濾過法、溶媒抽出法などを組合せることにより、有利に所期の目的を達することができる。なお、クラバラン酸の検出、定量には、電気泳動、薄層クロマトグラフィーまたはペーパークロマトグラフィーで分別後、被験菌に対する抗菌力を測定する方法、またはβ-ラクタマーゼ阻害活性を調べる方法（コールら、特開昭50-142789）が用いられる。またクラバラン酸の同定には元素分析、核磁気共鳴スペクトル、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル、濾紙電気泳動および薄層クロマトグラフィーなどが用いられる。クラバラン酸はかかる操作を組合せ

間培養した。この種培養物を、200ml容三角フラスコに、棉実粉（プロフロ（Traders Oil Mill Co. 米国製））2%、大豆粉2%および表4に示す種類および量の炭素源を添加した組成の培地（pH6.5）80mlを入れ、滅菌、冷却した菌懸液に1.5ml接種し、回転式振盪培養機上で28℃で培養し、5日目に培養物を取り出し、遠心分離にて菌体を除いた上澄液について、クラバラン酸の生成量を調べ、表4に示す結果を得た。

表4

炭素源	濃度	クラバラン酸の生成量 (μg/ml)
グルコース	6%	800
コーン・スターチ	6%	900
ソリコーブル・スターチ	6%	800
グリセロール	6%	1000
大豆油	6%	600
グルコース	8% 以上	1200
コーン・スターチ	8%	

実施例2

グルコース8%, コーン・スターチ8%, 綿実粉1%, 大豆粉0.5%, 酵母エキス0.5%, ポリペプトン0.5%, コーン・ステアー・リカー0.5%および炭酸カルシウム1%からなる種地500mlを2ℓ容坂口フラスコに分注し、滅菌後これにストレプトミセス・カツラハマヌス T-272(農工研申請書受理番号第3944号)の1斜面培養を接種し、往復式振盪培養機上で28℃、8日間培養した。別にステンレス製50ℓ容発酵槽に、グルコース8%, コーン・スターチ8%, 綿実粉1.5%および大豆粉1.5%からなる培地(pH6.5)80ℓを仕込み、常法により滅菌冷却した。これに上記種培養液を無菌的に接種し、28℃で通気攪拌培養(通気毎分80ℓ、攪拌毎分280回転)した。90時間培養後、培養物を取り出し、ろ過によつて菌体を除き、培養液25ℓを得た。このろ液中には、1150 μg/mlのクラバラン酸が含まれていた。

このろ液を強塩基性アニオン交換樹脂アンバーライトIRA-402(ローム アンド ハース

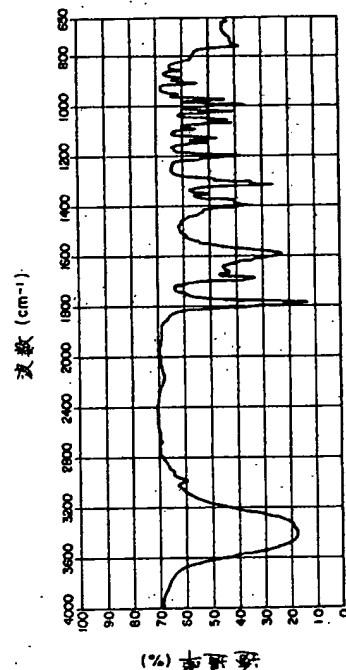
社、米国) Cl型6ℓを充填したカラムに通液し 1
クラバラン酸を吸着させる。吸着後15ℓの水で水洗し0.5M食塩水で溶出する。クラバラン酸を含む区分15ℓを2ℓの活性炭カラムに通液する。 5
通液後5ℓの水で水洗した後7%ブタノール水で溶出し、クラバラン酸を含む区分5ℓ(水洗液及び溶出液)を集め濃縮する。濃縮液を8ℓのセロースカラムに通し、75%ブタノール水で展開し、クラバラン酸区分を濃縮する。次いでこの濃縮液を1ℓのセファデックスG-15(ファルマシア社製)でゲルろ過精製した後、活性炭500 10
mlに吸着させ10%メタノール水で溶出する。クラバラン酸を含む区分を集め苛性ソーダ溶液でpH7.0に中和した後、濃縮し、濃縮液にエタノールを滴下して冷保すると結晶が析出する。これをろ 15
取乾燥し2.8gの結晶を得た。この結晶母液より同様にして更に1.1gの第二結晶を得た。別にストレプトミセス・クラバリゲルスHRR L-85 85
85を用い、コールらの方法に従つて調整したクラバラン酸ナトリウムとストレプトミセス・カツラ 20

ハマヌスT-272株より上述の様に得られた結晶とを比較したところ、それらの抗菌スペクトル、元素分析値、赤外線吸収スペクトル(KBrディスク、第1図参照)、核磁気共鳴スペクトル(D₂O、60MHz、第2図参照)、薄層クロマトグラフィーおよび電気泳動の挙動等全ての理化学的性状が一致した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ストレプトミセス・カツラハマヌスT-272の培養物から得られたクラバラン酸ナトリウムの赤外線吸収スペクトル(KBr法)を、第2図は、ストレプトミセス・カツラハマヌスT-272の培養物から得られたクラバラン酸ナトリウムの核磁気共鳴スペクトル(D₂O中、60MHz)を、それぞれ示す。

図 1
株



代理人 弁理士 松 居 祥 二

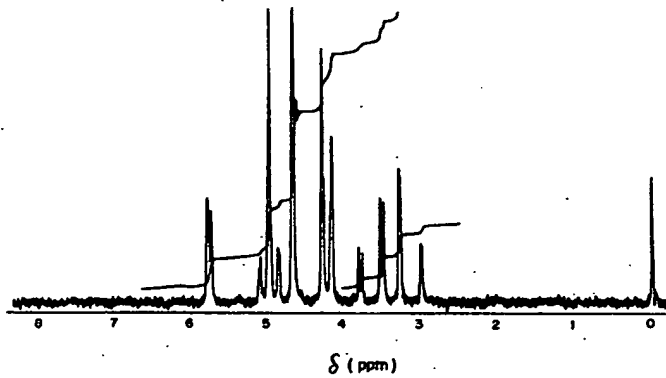


第 2 図

手 続 補 正 書

昭和52年 4 月 25 日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和52 年特許願第 20080 号

2. 発明の名称

抗生物質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 大阪市東区道修町2丁目27番地

名 称 (293) 武田薬品工業株式会社

代表者 小西新兵衛

4. 代 理 人

住 所 大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

氏 名 弁護士(5844) 松 居 祥 二

東京連絡先(特許係) 電話 278-2219

特 許 庁

52. 4. 27

5. 補正の対象

1

特許願の添付書類の目録の欄および明細書の発
明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

(1)特許願第2頁第6行の、「微生物受託申請書受
理番号票」を「微生物受託番号通知書」に訂正す
る。

5

(2)明細書第18頁第19行の、「申請書受理番号
第8944号」を「FERM-P №8944」
に訂正する。

10

(3)同第17頁第19行および同第19頁第7行の、
「微工研申請書受理番号第8944号」を「FE
RM-P №8944」にそれぞれ訂正する。

(4)同第18頁表4の炭素源の第8番目の、「ソリ
コープル・スターチ」を「ソリユープル・スター
チ」に訂正する。

15

7. 添付書類の目録

微生物受託番号通知書(写)

1通

以 上

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.